

aldosterone) and XIII (21-desoxy-17-*iso*-aldosterone), both of which have been accessible as yet only with difficulty.

The primary reduction product III, although it is produced almost exclusively from II by the action of diisobutyl aluminium hydride in toluene solution at -20° , undergoes a rather unexpected intramolecular change when the reaction mixture is allowed to stand at room temperature, resulting in the formation of the glycol ether V. Some mechanistic features of this secondary transformation are briefly discussed.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel
Pharmazeutische Abteilung

314. Aktivierung der Propionyl-CoA-Carboxylase^{1) 2)}

Kurze Mitteilung

von Halina Y. Neujahr³⁾ und S. P. Mistry⁴⁾

Herrn Prof. F. LEUTHARDT zum 60. Geburtstag gewidmet

(12. VII. 63)

Propionyl-CoA-Carboxylase wurde von OCHOA *et al.*^{5) 6)} aus Schweineleber-Homogenaten und von LANE *et al.*^{7) 8)} aus Kalbsleber-Mitochondrien isoliert. Das Enzym katalysiert die reversible Carboxylierung von Propionyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA⁹⁾. Das kristallisierte Enzym enthält Biotin⁶⁾.

Bei unseren Untersuchungen über die Rolle des Biotins im Intermediärstoffwechsel fanden wir, dass die Aktivität des Enzyms aus Rattenleber-Mitochondrien um ein Vielfaches durch *in vitro* Zugabe einer überstehenden Fraktion (S3) aus Leber, der an sich keine enzymatische Aktivität zukommt, gesteigert werden konnte. Ausserdem fanden wir Propionyl-CoA-Carboxylase auch im Gesamtüberstehenden aus Leber. Dieses Enzym konnte jedoch nicht durch die S3-Fraktion aktiviert werden. Die mögliche Anwesenheit von Biotin in der S3-Fraktion wurde durch

¹⁾ Ein vorläufiger Bericht wurde an der 46. Jahresversammlung der Federation of American Societies for Experimental Biology mitgeteilt. H. Y. NEUJAHN & S. P. MISTRY, Federation Proc. 27, 239 (1962).

²⁾ Die Untersuchungen wurden durch Beiträge der U.S. NATIONAL SCIENCE FOUNDATION und des U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE unterstützt.

³⁾ Gegenwärtige Adresse: Division of Food Chemistry, Royal Institute of Technology, Stockholm 70, Sweden.

⁴⁾ Spezial-Stipendiat des U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE, NATIONAL INSTITUTE OF ARTHRITIS AND METABOLIC DISEASES.

⁵⁾ Y. KAZIRO, E. LEONE & S. OCHOA, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 46, 1319 (1960).

⁶⁾ Y. KAZIRO, S. OCHOA, R. C. WARNER & JO-YEN CHEN, J. biol. Chemistry 236, 1917 (1961).

⁷⁾ D. R. HALENZ & M. D. LANE, J. biol. Chemistry 235, 878 (1960).

⁸⁾ M. D. LANE, D. R. HALENZ, D. P. KOSOW & C. S. HEGRE, J. biol. Chemistry 235, 3082 (1960).

⁹⁾ A. TIETZ & S. OCHOA, J. biol. Chemistry 234, 1394 (1959).

Untersuchungen mit ^{14}C -Biotin¹⁰⁾ und Avidin¹⁰⁾ geprüft. Die Resultate, insbesondere die Avidinempfindlichkeit, ergaben zuerst Hinweise auf eine Biotin-Coenzym Aktivität. Bei der Reinigung der S3-Fraktion wurde jedoch festgestellt, dass Kalium-Ionen einen ähnlichen aktivierenden Effekt auf die mitochondriale Propionyl-CoA-Carboxylase ausüben. Dies wurde mit kristallisiertem Enzym bestätigt.

Einige Resultate dieser Untersuchungen seien kurz beschrieben:

Die Anwesenheit von Propionyl-CoA Carboxylase im Überstehenden aus Lebre wurde bisher von keiner Seite publiziert, doch zeigen die Resultate in Tabellen 1 und 2 deutlich, dass nicht nur Überstehendes aus Rattenleber, sondern auch aus Ochsen- und Schweineleber beträchtliche Enzymmengen enthält. Das Enzym aus Überstehendem scheint bei der Ratte ebenso aktiv zu sein wie das mitochondriale Ferment. Die Aktivität des ersteren wird durch das ursprüngliche Homogenisierungsmilieu, das Saccharose und EDTA enthält, deutlich gehemmt und erholt sich erst wieder nach Behandlung mit Ammoniumsulfat. Wie Tabelle 1 zeigt, ist die Verminderung

Tabelle 1. *Propionyl-CoA-Carboxylase in Überstehendem und in Mitochondrien von Rattenleber*

Zellfraktion	Enzymaktivität	
	c.p.m. [^{14}C]O ₂ per mg Eiweiss	fixiert Total
Überstehendes (105000 g)		
in Tris, pH 7,5	2500	83100
in Saccharose-EDTA, pH 7,8	240	48450
in Saccharose-EDTA, pH 7,8, mit 50 × Mg ⁺⁺	180	38500
in Saccharose-EDTA, pH 7,8, fraktioniert mit 35–55% (NH ₄) ₂ SO ₄	16600	265000
Mitochondrien (Acetontrockenpulverextrakt)	12000	192000

Der Standardansatz enthielt in 0,75 ml neben 0,1 ml Enzymlösung (in μMolen): Glutathion 2,5; ATP 2; MgCl₂ 2; NaH[^{14}C]O₃ 7,5 (1,175 μc); Propionyl-CoA 0,5; Trispuffer pH 8,4 50. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Propionyl-CoA gestartet und nach zwanzigminütiger Inkubation bei 37° mit 0,1 ml 20% TCA gestoppt. Die Mischung wurde darauf 5 Min. unter dem Abzug bei 60° gehalten, um überschüssiges NaH[^{14}C]O₃ zu entfernen, und dann bei niedriger Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Methylmalonat und Succinat enthaltende Überstehende wurde darauf auf seine Radioaktivität hin analysiert.

Tabelle 2. *Propionyl-CoA-Carboxylase in Überstehendem von Ochsen- und Schweineleber*

Fraktion des Überstehenden aus	Enzymaktivität	
	c.p.m. [^{14}C]O ₂ per mg Eiweiss	fixiert
Ochsenleber, 0–55% (NH ₄) ₂ SO ₄	7105	
Ochsenleber, 35–55% (NH ₄) ₂ SO ₄	7735	
Schweineleber, 35–55% (NH ₄) ₂ SO ₄	5610	

Versuchsbedingungen s. Tabelle 1

¹⁰⁾ Wir danken Herrn Prof. O. WISS c/o HOFFMANN-LA ROCHE, Basel, bestens für das uns für diese Untersuchungen gratis zur Verfügung gestellte [^{14}C]-Biotin. Ebenso sprechen wir Herrn Dr. DAKSHINAMURTI für das uns überlassene Avidin und Herrn Dr. Y. KAZIRO für die kristalline Propionyl-CoA unseren Dank aus.

der Aktivität nicht auf den Gehalt des Milieus an Magnesium-Ionen zurückzuführen. Einige typische Daten über die Aktivität der Propionyl-CoA-Carboxylase sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Eine S3-Fraktion aktivierte das Enzym ungefähr drei-

Tabelle 3. *Aktivierung der Propionyl-CoA-Carboxylase durch K⁺*

Zusatz zum mitochondrialen Enzym aus normaler Rattenleber	ohne	S3	K ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄ 5 μMole	Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄ 5 μMole	KCl 5 μMole
Enzymaktivität in c.p.m. [¹⁴ C]O ₂ , fixiert per mg Eiweiss	371	1035	896	279	1240

Versuchsbedingungen s. Tabelle 1. Enzymlösung: Extrakt eines Acetontrockenpulvers aus Rattenlebermitochondrien. S3 wurde aus dem mit 105000 g (1 Std.) zentrifugierten Überstehenden aus Rattenleber hergestellt: Die 35-55%-(NH₄)₂SO₄-Fraktion wurde langsam mit eiskalter 0,1M HCl unter Rühren auf pH 3 angesäuert, 1 Std. bei 0° gehalten und darauf zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,2N NaOH neutralisiert. Die S3-Fraktion enthielt keine Propionyl-CoA-Aktivität.

fach. Versuche, die Fraktion mit Adsorbentien zu reinigen, ergaben eine leichte Aktivitätssteigerung durch das Eluat. Dies führte uns dazu, einige Salze auf ihren aktivierenden Effekt hin zu prüfen. Wie es sich zeigte, kann die Aktivierung durch die S3-Fraktion mit Kalium-Ionen völlig imitiert werden. Ein Einfluss von Phosphationen wird durch das Resultat mit Natriumphosphat ausgeschlossen. Dass Kaliumphosphat weniger stark wirkt als die äquivalente Menge von Kaliumchlorid könnte auf die unvollständige Dissoziation des Phosphates beim verwendeten pH zurückgeführt werden. Eine Erhöhung der Konzentration der Magnesium-Ionen kann die Wirkung der Kalium-Ionen nicht ersetzen. Spätere Untersuchungen zeigten, dass 1 μMol K⁺ pro Ansatz völlig genügt. Dies entspricht der Konzentration an Kalium-Ionen, die durch Zusatz der S3-Fraktion hervorgebracht wird. Die Resultate mit kristallisierter Propionyl-CoA-Carboxylase (s. Tabelle 4) bestätigen unsere Befunde. Allerdings ist die Aktivierung durch K⁺ bei dem kristallisierten Enzym, wenn auch immer vorhanden, so doch weniger ausgesprochen als bei dem unfraktionierten Enzym.

Tabelle 4. *Aktivierung kristalliner Propionyl-CoA-Carboxylase durch K⁺*

Zusatz	Versuch	Enzymaktivität, c.p.m. [¹⁴ C]O ₂ fixiert				
		1	2	3	4	5
ohne		870	885	578	815	595
KCl, 5 μMole		1395	1325	1140	1040	970

Versuchsbedingungen s. Tabelle 1

Biochemisches Institut der Universität Zürich
und Department of Animal Science, University
of Illinois, Urbana, Illinois, USA.